

**Conjugates of biologically stable polymers and polynucleotides for treating systemic lupus erythematosus.**Patent Number: ☐ EP0438259, B1Publication  
date: 1991-07-24

Inventor(s): COUTTS STEPHEN (US); CONRAD MICHAEL J (US)

Applicant(s): JOLLA PHARMA (CA)

Requested  
Patent: ☐ PT96503Application  
Number: EP19910300262 19910115Priority Number  
(s): US19900466138 19900116; US19900494118 19900313IPC  
Classification: A61K39/44; A61K47/48; A61K48/00EC  
Classification: C07H21/00C4, A61K47/48R2TEquivalents: AU640730, AU6941891, CA2034197, DE69120303D, ES2090233T, ☐ FI107514B,  
FI923241, ☐ IE910131, ☐ JP2001354569, JP5505520T, NO303940B, NO922781,  
☐ US5162515, ☐ WO9110426Cited  
Documents: US4191668; US4650675; WO8609628**Abstract**

Chemically defined conjugates of biologically stable polymers, such as copolymers of D-glutamic acid and D-lysine, and polynucleotide duplexes of at least 20 base pairs that have significant binding activity for human lupus anti-dsDNA autoantibodies. The duplexes are preferably homogeneous in length and structure and are bound to the polymer via reaction between an amino-reactive functional group located at or proximate a terminus of each duplex. These conjugates are tolerogens for human systemic lupus erythematosus.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

**BEST AVAILABLE COPY**

**DESCRIÇÃO**  
**DA**  
**PATENTE DE INVENÇÃO**

**N.º. 96.503**

**REQUERENTE: LA JOLLA PHARMACEUTICAL COMPANY**

**EPÍGRAFE: "CONJUGADOS DE POLIMEROS E POLINUCLEOTIDOS BIO-  
LOGICAMENTE ESTAVEIS PARA O TRATAMENTO DO LUPUS  
ERITEMATOSO SISTEMICO"**

**INVENTORES:** Michael J. Conrad e Stephen Coutts, cientistas norte  
americanos, residentes respectivamente em 11336 Penacova  
Street, San Diego, CA 92129, e em 6151 Rancho Diegueno  
Road, Rancho Santa Fe, CA 92067, Estados Unidos da América

**Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4.º da Convenção de Paris  
de 20 de Março de 1883.**

**16 de Janeiro de 1990 e 13 de Março de 1990, nos Estados Unidos da América, sob os N.ºs  
466.138 e 494.118**

Titular: LA JOLLA PHARMACEUTICAL COMPANY

Epigrafe: "CONJUGADOS DE POLIMEROS E POLINUCLEOTIDOS  
BIOLOGICAMENTE ESTAVEIS PARA O TRATAMENTO DO LUPUS  
ERITEMATOSO SISTEMICO"

## M E M O R I A   D E S C R I T I V A

### Descrição

#### Campo Técnico

Este invento relaciona-se com composições para tratamento do lupus eritematoso sistêmico, doença auto-imune (SLE ou "lupus"). Mais particularmente, relaciona-se com conjugados de polimeros biologicamente estáveis, preferivelmente copolímeros do ácido D-glutâmico (representado aqui pela simples designação letra "E") e D-lisina (representado aqui pela simples designação letra "K"), e certos polinucleótidos que foram encontrados como sendo eficazes para indução de tolerância para antigênios envolvidos no SLE. Os copolímeros preferidos são representados aqui pela designação "D-EK".

#### "Background"

A imunotolerância descreve o mecanismo que conduz à forma de imunossupressão frequentemente permanente e de longa

fornecimento de tal tratamento para o SLE.

Benacerraf, Katz e os seus colegas investigaram e descreveram a utilização dos conjugados do D-EK com haptenos e vários antigênicos para induzir imunotolerância específica. Os seus estudos iniciais envolveram conjugados do hapteno sintético 2,4-dinitrofenil (DNP) em porquinhos da índia e ratos, e mostraram que os conjugados poderiam induzir tolerância para o DNP. Estes estudos iniciais foram estendidos a outros haptenos/antigênicos tais como antigênicos E de tasna e benzilpeniciloide (BPO). Ver Patentes dos E. U. nº 4.191.668 e 4.220.565.

A Patente 4.191.668 dos E. U. (Exemplo IV) descreve a preparação dos conjugados do D-EK e oligonucleótidos isolados do DNA do timo de vitela purificado de DNase. Os oligonucleótidos foram caracterizados como sendo constituídos por "menos de 10 nucleótidos". Embora a coluna 11 da Patente dos E. U. 4.191.668 indique que o invento deles tem valores terapêuticos para o tratamento da doença auto-imune e mencione o SLE, não foram apresentados dados sobre os efeitos imunológicos dos conjugados oligonucleótidos do D-EK mencionados.

Katz e os seus colegas também investigaram o potencial dos conjugados do nucleósido-D-EK para induzir tolerância aos ácidos nucleicos determinantes. Eshar e outros no J. Immunology (1975) 114: 872 - 876. Neste assunto em questão, os nucleósidos individuais estão extensamente acreditados como sendo os determinantes principais da especificidade no lupus antisera. Eles administraram conjugados do copolímero D-EK e quatro ribonucleósidos ao SJL ou rato da espécie Balb/c, e

subsequentemente imunizaram os ratos, tratados com uns conjugados de (KHL)-ribonucleosidos de hemocianina da lapa lanceteira. Em ambas as espécies, a capacidade de ligação antigênio anti-nucleosido do sera foi diminuída para níveis detectáveis com simplicidade. Enquanto estes estudos mostraram que tais conjugados poderiam produzir imunotolerância aos nucleosidos, eles não mostraram que tais conjugados fossem eficazes no tratamento do SLE.

Outros investigadores têm estudado conjugados de nucleosidos ou DNA com outros transportadores. Borel e outros (Science (1973) 182:76) avaliaram a capacidade dos conjugados IgG-nucleosidos do rato isogênico para reduzir a resposta do anticorpo para o DNA desnaturado em animais jovens da espécie de ratos NZB. Esta espécie é usada como modelo para alguns fenômenos auto-imunes. Eles tendem a produzir anticorpos para ácidos nucleicos determinantes que formam imunocomplexos que se alojam nos rins e conduzem a nefrite glomerular. Nestes estudos, os animais tratados produziram níveis significativamente reduzidos de anticorpos DNA anti-desnaturados e exibiram menor nefrite glomerular membranosa do que o controlo e animais livres tratados com nucleosidos. Em estudos separados, Parker e outros (J. Immunol (1974) 113 : 292) avaliaram os efeitos do conjugado DNA desnaturado para a poli-D-lisina e/ou ciclofosfamida na progressão do síndrome descrito atrás, em ratos NZB. Estes estudos demonstraram um aumento significativo na sobrevivência e uma diminuição significativa na capacidade de ligação DNA para os animais tratados quando comparados com os controlos. Nenhum destes estudos, no entanto, foram direccionados para produção de

tolerância para o dsDNA que parecem ser os antígenos principais envolvidos no SLE humano.

Num artigo posterior (Ann Ny Acad Sci (1986) 475 : 296-306) Borel e outros sugerem que a realização da imunoterapia específica para o SLE tem sido impedida por "uma incapacidade para ligar os fragmentos de DNA a proteínas solúveis". Citando os trabalhos anteriores de Stoller (Papalian e outros; J. Clin Invest (1980) 65 : 469 e Stoller e Papalian, J. Clin Invest (1980) 66 : 210), os autores referem que um tamanho mínimo de, pelo menos, 10 - 40 pares de bases do DNA é necessário para ligar o anticorpo anti-DNA produzido nos doentes de SLE. O artigo descreve conjugados imunoglobulino-oligonucleótidos feitos por ligação de uma fracção de DNA nativa "um pouco maior que 10 pares de bases" usando glutaraldeído como agente de ligação. A Figura 2 do artigo descreve os estudos usados para seleccionar a fracção do DNA. Aquela Figura descreve a reactividade das várias fracções de DNA ligadas às células vermelhas do sangue do carneiro, via glutaraldeído com anticorpos anti-DNA no soro BWF. Nestes

1

testes, a fracção designada "70 - 80" foi a mais reactiva. O tamanho dessa fracção é descrito com sendo "um pouco maior" que a fracção "81 - 101" que corresponde a "cerca de 10 oligonucleótidos". A seguinte maior fracção em relação à "70 - 80", designada "40 - 69", exibiu reactividade significativamente reduzida, relativamente à fracção 70 - 80. Será apreciado que a fracção "um pouco maior que 10 pares de bases" seja heterogênea no tamanho e, devido ao procedimento de ligação, é ligada à imunoglobulina num local ao acaso na cadeia. Além disso, devido ao agente de ligação bifuncional ser usado, é provável que alguns

graus da ligação cruzada (cross-linking) tenham ocorrido na reacção de acoplagem. Assim, o conjugado descrito neste artigo não é uma metade definida quimicamente na medida em que (a) O comprimento do oligonucleótido não é especificado, (b) a fracção do oligonucleótido contém cadeias de comprimento variável, (c) o local da ligação à imunoglobulina, ao longo do comprimento da cadeia de oligonucleótido é aleatório (d) há alguns graus de cross-linking, e (e) oligonucleótidos não conjugados mas ligados por cruzamento pode não ser separado do material conjugado.

Borel e outros têm recentemente (J. Clin Invest (1988 B2: 1901 - 1907) relatado estudos in vitro usando conjugados de imunoglobulina humana ligados, ou a DNA total sintetizado (designado N<sub>10-100</sub>), ou a 20 - 30 fracções de pares de bases (designada N<sub>20-30</sub>) usando glutaraldeído como agente de ligação.

Os conjugados foram relatados como exibindo propriedades geneticamente toleráveis in vitro em PBL's de doentes de SLE. Estes conjugados, no entanto, semelhantes àquele relatado no seu artigo de 1986, também são produzidos com misturas heterogêneas de oligonucleótidos usando métodos que produzem, não especificamente, cadeias de cross-linking. A partir desta altura, nem a química nem a actividade biológica destes conjugados seria suficientemente reproduzível para permitir que eles sejam aprovados como farmacêuticos.

#### Descoberta do invento

Em contraste com a técnica anterior, os requerentes têm desenvolvido conjugados definidos quimicamente de polímeros biologicamente estáveis, e duplexes de polinucleótidos que são

geneticamente toleráveis para o SLE humano. Estes duplexes são definidos no que diz respeito ao comprimento, local de ligação ao polímero, estrutura helicoidal, afinidade obrigatória para os anticorpos anti-dsDNA do SLE humano. Consequentemente, as suas actividades química, e de tolerância genética são reproduzíveis num grau que torna estes conjugados responsáveis para controlo de qualidade e aprovação como farmacêuticos.

Assim, um aspecto do invento é um conjugado de um polímero biologicamente estável e uma multiplicidade de duplexes polinucleótidos de, pelo menos, cerca de 20 pares de bases cada uma ligada ao polímero, actividade de ligação significativa para os auto-anticorpos anti-dsDNA do SLE humano. Numa configuração preferida destes conjugados, os duplexes são substancialmente homogêneos em comprimento e são acoplados ao polímero em ou próximo (isto é, dentro de cerca de 5 pares de bases) de um dos seus finais, de tal maneira que cada duplex forma uma cadeia pendente, de pelo menos, cerca de 30 pares de bases, medida a partir do local de ligação do duplex ao polímero até ao fim livre da cadeia.

Composições farmacêuticas contendo estes conjugados e métodos para tratamento do SLE que empregam estes conjugados são outros aspectos do presente invento.

Ainda outro aspecto é um conjugado de (a) um polímero biologicamente estável e (b) uma multiplicidade de duplexes polinucleótidos, cada um deles e todos ligados ao polímero por um grupo funcional localizado em, ou próximo do terminus de uma das cadeias do duplex, sendo o dito conjugado tolerável geneticamente ao SLE humano.



Um aspecto posterior do invento é um método para fabricar os conjugados descritos em cima, compreendendo: a reacção de uma multiplicidade de polinucleótidos de cadeia simples, em que cada um deles tem pelo menos cerca de 20 nucleótidos em comprimento e tem um grupo funcional em, ou próximo de um dos seus terminus, que reage com grupos amino livres no polímero, para formar um conjugado e emparelhando complementarmente polinucleótidos de cadeia simples, aos polinucleótidos de cadeia simples, conjugados com o polímero para formar cadeias pendentes de DNA de cadeia dupla.

#### Breve Descrição das Figuras

A Figura 1 é um gráfico dos dados obtidos através dos testes descritos no Exemplo 1.

A Figura 2 e 3 são reproduções do espectro CD descrito no Exemplo 3.

A Figura 4 é um gráfico comparando as capacidades de ligação do antisera do SLE às DNAs tendo tipos diferentes de configurações helicoidais.

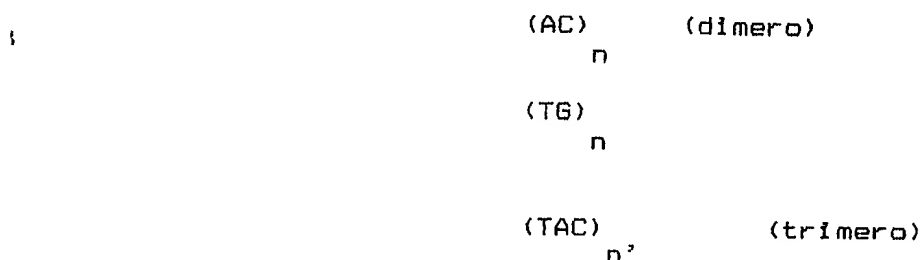
As Figuras 5 - 8 são gráficos de dados obtidos nos testes descritos no Exemplo 5.

#### Modos de Concretização do Invento

O componente do polímero do conjugado é biologicamente estável, isto é, ele exhibe in vitro uma meia-vida de excreção de dias até meses. Estes polímeros são também substancialmente não imunogênicos (isto é, eles exibem nenhuma ou apenas fraca imunogeneidade quando administrados aos animais) e são

constituídos preferencialmente por uma cadeia simples sintética de composição definida. Eles terão normalmente um peso molecular médio na ordem de cerca de 5.000 até cerca de 200.000, preferivelmente 5.000 até 50.000. Exemplos de tais polímeros são polietilenoglicol, poli-D-lisina, álcool polivinílico, polivinilpirrolidona, imunoglobulinas, e D-EK. Os polímeros preferidos particularmente são os D-EK's tendo um peso molecular de cerca de 5.000 até cerca de 50.000 e uma proporção molar E:K de aproximadamente 60:40.

Os duplexes polinucleótidos sintéticos, que são acoplados aos polímeros biologicamente estáveis, são compostos por, pelo menos, cerca de 20 bp, mais usalmente, pelo menos 30 bp, tipicamente 30 - 250 bp, e preferivelmente 50 - 150 bp. Preferivelmente, os duplexes são substancialmente homogêneos em comprimento; ou seja, a variação em comprimento na população não excederá normalmente cerca de  $\pm 20\%$ , preferivelmente  $\pm 10\%$ , do comprimento médio do duplex em pares de bases. Eles são também, preferivelmente, substancialmente homogêneos na composição de nucleótidos; ou seja, a sua composição de base não variará mais de cerca de 10%. Mais preferencialmente, eles são inteiramente homogêneos na sua composição de nucleótidos. Em termos de composição, o sintético preferido ou dsDNA recombinante é constituído preferencialmente por cadeias de unidades mer de repetição, complementarmente de 2 - 4 bases (isto é, um dímero de repetição, trimeros ou tetralmeros), tais como



(ATG)  
n'

(GCTA) (tetraímero)  
n''

(CGAT)  
n''

em que n, n', e n'' são números inteiros seleccionados para fornecer o número desejado de pares de bases. Polinucleótidos constituídos de dímeros isoméricos, por exemplo, poli d(AC): poli d(GT) e poli d(AG): poli d(CT) são os mais preferidos.

Com base na interpretação do espectro dicróico circular (CD), acredita-se que os duplexes, que são úteis no invento, assumem uma estrutura helicoidal típica B-DNA. Deveria ser entendido que não é intenção que o invento seja limitado por estas convicções e que os duplexes possam, após análises mais conclusivas, assumir estruturas helicoidais típicas de Z-DNA e/ou A-DNA. As hélices de sentido directo das formas de B-DNA, tendo pares de bases aproximadamente perpendiculares ao eixo longitudinal helicoidal dos outros dois tipos de hélices de DNA. As estruturas helicoidais dos diferentes tipos de DNA podem ser caracterizadas pelo espectro dicróico circular (CD). O espectro CD das formas B de DNA exhibe (1) bandas dicróicas positivas associadas com a helicidade de sentido directo nas porções do espectro abaixo de 250 nm, mas separadas das bandas dicróicas de comprimento de onda longo positivo superiores a 206 nm por um mínimo significativo num comprimento de onda entre 240 e 260 nm, e (2) um singelo pico nítido, superior a 250 nm, com um salto azul máximo relativo à máxima vista no espectro das formas A do RNA, e DNA e centrados num comprimento de onda entre 270 e 290

nm. Por meio da comparação geral das outras duas formas helicoidais do DNA, o Z-DNA é distinguido pela sua curva helicoidal estreita de sentido inverso com pares de bases não posicionados, simetricamente em volta do eixo helicoidal, e o A-DNA forma uma hélice mais aberta de sentido directo, em que os pares de bases são orientados obliquamente ao eixo helicoidal longitudinal e são puxados para fora do centro da hélice.

Estes duplexes polinucleotídicos podem ser sintetizados a partir do DNA nativo, ou sintetizado por técnicas químicas ou recombinantes. O dsDNA, ocorrendo naturalmente ou produzido recombinantemente, de longo comprimento, pode ser purificado (por exemplo, enzimaticamente, quimicamente, ou por cisão mecânica) e fraccionados (por exemplo, por gel de agarose ou coluna de Sephadex), para obter polinucleótidos do comprimento desejado.

Alternativamente, pares de cadeias polinucleotídicas de cadeias simples e complementares, encadeados com até cerca de 70 bases em comprimento, são preparados rapidamente usando sintetizadores de DNA disponíveis comercialmente, e depois emparelhados para formar duplexes pelos procedimentos convencionais. Os dsDNA sintéticos de comprimento longo podem ser obtidos por extensão enzimática (5'-fosforilação seguida de ligação) das cadeias pequenas produzidas quimicamente.

Os polinucleótidos também podem ser produzidos por clonagem molecular. Por exemplo, os oligonucleótidos de comprimento e sequência desejada são sintetizados como acima. Estes oligonucleótidos podem ser concebidos para terem terminus apropriados para ligação em locais de restrição específica. Repetições múltiplas destes oligômeros podem ser ligadas em fila

para promover as replicações de múltiplas cópias. As construções resultantes são inseridas num vector de clonagem padrão, e o vector é introduzido numa célula/microorganismo adequado, por transformação. Os transformados são identificados por marcadores padrão e são aumentados sob condições que favorecem a replicação do DNA. Os polinucleótidos podem ser isolados do outro DNA das células/microorganismos por tratamento com enzimas de restrição e fraccionamento de tamanho convencional (por exemplo, gel de agarose, colunas de Sephadex).

Alternativamente, os oligonucleótidos podem ser replicados pela tecnologia de reacção em cadeia de polimerase (PCR). Saiki, R. K., e outros, Science (1988) 230:1350; Sacki, e outros, Science (1988) 239:487; Sambrook, e outros, In Molecular Cloning Techniques : A Laboratory Manual, vol. 12, p. 14, 1 - 14, 35 Cold Spring Harbor Press (1989).

Em contraste com os conjugados da indústria anterior, cada duplex polinucleotídico empregue no presente invento exhibe actividade de ligação significativa com o SLE antisera. Preferivelmente, eles são substancialmente homogêneos em comprimento. Neste aspecto, os polinucleótidos da técnica anterior eram heterogêneos em comprimento e constituídos por uma mistura de cadeias, sendo algumas ou todas elas pequenas demais para exibirem tal actividade. Os polinucleótidos podem ser pesquisados quanto à actividade de ligação com o SLE antisera pelos ensaios descritos nos exemplos. O ensaio Farr modificado, em que a actividade de ligação pode ser expressa como  $I_{50}$  (a concentração polinucleotídica, em nucleótidos molares, resultando em metade da inibição máxima) é um ensaio preferido. Os duplexes

polinucleotídicos tendo um I de menos do que cerca de 500nM,  
50

preferivelmente menos de 50 nM, considera-se que têm actividade de ligação significativa e são, por isso, úteis para o fabrico dos conjugados deste invento.

Os polinucleótidos são ligados ao polímero de uma maneira que preserva a sua actividade de ligação. Isto é feito pelo acoplamento do polinucleótido ao polímero num local pré-determinado na cadeia polinucleotídica, de tal forma que o polinucleótido forma uma cadeia pendente, de pelo menos cerca de 30 pares de bases medida desde o local de acoplamento até ao fim livre (não ligado a nada) da cadeia. Em contraste, a técnica de acoplamento de glutaraldeído ensinada por Borel e outros, refere causas de acoplamento em locais aleatórios, ao longo da cadeia, e ligações cruzadas. Assim, usando aquela técnica, cadeias maiores do que 20 pares de bases podem ser acopladas num local intermédio na cadeia para formar cadeias pendentes de, substancialmente, menos do que 20 pares de bases em comprimento, ou as cadeias podem ser juntamente acopladas para formar redes ligadas cruzadamente de tamanho indefinido.

Preferivelmente, os duplexes polinucleotídicos dos conjugados do invento são acoplados ou conjugados ao polímero num local em, ou próximo de um dos seus extremos. Várias conjugações estratégicas estão disponíveis para a ligação dos oligonucleótidos ao biopolímero. O polinucleótido pode ser acoplado ao polímero na extremidade 3' do polinucleótido, via uma ponte morfolina, formada pela condensação de uma ribose terminal 3' oxidada numa das cadeias do polinucleótido, com um grupo amino livre no polímero, e depois sujeitando o aducto à condição de

redução, para formar as ligações morfolinas. Tal acoplamento requer que o polímero tenha, pelo menos, um número igual de grupos amino livres (por exemplo, os grupos amino epsilon do D-EK) para o número de duplexes polinucleotídicos para serem ligados ao polímero. A síntese de um tal conjugado é conduzida em dois passos. O primeiro passo é o acoplamento de uma cadeia de duplexes polinucleotídicos ao polímero, via a reação de condensação/redução descrita atrás. A ribose terminal 3' oxidada é formada na cadeia polinucleotídica simples, pelo tratamento da cadeia com periodato, para converter o grupo ribose terminal 3' num grupo ribose oxidado. O polinucleótido de cadeia simples é depois adicionado suavemente a uma solução aquosa do polímero de pH de cerca de 6,0 até 8,0, a 2 - 8°C. A razão molar do polinucleótido para o polímero em todas as conjugações estratégicas será normalmente na ordem de cerca de 2:1 até cerca de 30:1, preferivelmente cerca de 5:1 até 10:1. Durante ou depois da reação de condensação (normalmente o tempo de reação de 24 até 48 horas), um agente de reação forte, tal como o cianoborodrido de sódio, é adicionado para formar o grupo morfolino. A cadeia complementar do duplex é depois adicionada ao conjugado, e a mistura é aquecida e suavemente arrefecida para originar as cadeias para emparelhar. O conjugado pode ser purificado por cromatografia de permeação em gel.

Outra estratégia envolve formação de grupos funcionais aldeídos terminais nos oligonucleótidos, e usando os grupos funcionais para acoplar o oligonucleótido ao polímero, via os grupos amino existentes nesse local. Podem ser tiradas vantagens do facto de que o gem, os dois vicinais, ligados à extremidade

3' do oligonucleótido, podem ser oxidados com periodato de sódio para produzir aldeídos que podem condensar-se com os grupos amino do polímero. Quando os dióis se encontram num sistema de anel, por exemplo, um anel com 5 membros, o produto da condensação resultante é um anel heterocíclico contendo nitrogênio, por exemplo, um morfolino com seis membros ou anel piperidino. O produto da imino-condensação é estabilizado pela redução com um agente de redução adequado, por exemplo, boroidrido de sódio ou cianoboroidrido de sódio. Quando o diol é acíclico, o produto de oxidação resultante contém só um aldeído, e o produto da condensação é uma amina secundária.

A estratégia do diol vicinal também pode ser continuado por ligações 5'-terminais. Isto é completado pela formação de derivados cianoetilfosforamiditos de um grupo hidroxil terciário num triol, onde os grupos hidroxil restantes são vicinais, por exemplo, 3,4-cis-diidroxil,1-hidroximetilciclo-pentano. Neste caso específico, os grupos diidroxil vicinais estão bloqueados com dimetilsilano, e o grupo diidroxil primário é conseguido com 2-cianoetil-N,N-diisopropilclorofosforamidito. O derivado resultante é usado no último passo de síntese do oligonucleótido padrão, e transforma-se no resíduo 5'-terminal. Após o desbloqueamento do oligonucleótido e remoção do grupo dimetilsililo com o ião fluorido, ácido, ou base, o diol vicinal pode ser oxidado com periodato e condensado com grupos amino, como atrás. Uma estratégia similar pode ser seguida para os trióis acíclicos para serem usados como ligantes 5'-terminais.

Outro procedimento envolve a introdução de metades alquilamino ou alquilsulfidrilo, quer dentro das extremidades 3'



ou 5' do oligonucleótido, pela química de nucleótidos apropriada, por exemplo, a química do fosforamidato. Os grupos nucleofílicos podem depois ser usados para reagir com o grande excesso de reagente de cross-linking homobifuncional, por exemplo, dimetil suberimidato, no caso de derivados alquilaminas, ou um excesso de reagente de cross-linking heterobifuncional, por exemplo, ester de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS), ou succinimidil (4-iodoacetil) aminobenzoato (SIAB), para os derivados alquilsulfidrilo. Uma vez removido o excesso do ligante de cruzamento, os derivados oligonucleótidos vão reagir com grupos amino no polímero.

Ainda outra estratégia emprega nucleósidos modificados. Derivados deoxinucleósidos adequados podem ser incorporados, por química sintética de DNA padrão, numa posição desejada no oligonucleótido, preferivelmente na extremidade 5' ou 3'. Estes derivados nucleósidos podem reagir depois específica e directamente com grupos alquiloamino no polímero. Alternativamente, reacções secundárias verificadas com a química do dialdeído químico descrito atrás, tal como a eliminação-beta catalizada por aminas, podem estar envolvidas pela aplicação de derivados nucleósidos apropriados, como o terminus 3' da cadeia a ser ligada. Um exemplo disto é a extensão 5'-metileno da ribose; isto é, um grupo 5' (2-hidroxietil) em vez de um grupo 5'-hidroximetil. Uma alternativa seria usar um fosfonato ou uma ligação fosfinato para o dinucleótido 3' terminal do oligonucleótido a ser ligado ao polímero.

A capacidade dos conjugados para actuar como SLE geneticamente tolerável e suprimir especificamente a produção de

anticorpos anti-dsDNA pode ser avaliada no modelo murino descrito nos exemplos.

Os conjugados normalmente serão formulados para administração por injeção (por exemplo, intraperitonealmente, intramuscularmente, etc.). Consequentemente, eles serão tipicamente combinados com portadores aquosos, farmacologicamente aceitáveis tais como salina, solução de Ringer, solução dextrose, e outras. O conjugado normalmente constituirá cerca de 0,01% até 10% por peso da formulação. O conjugado é administrado a um indivíduo em quantidades suficientes para, pelo menos, restabelecer parcialmente a tolerância para os antígenos causadores do SLE. Tais quantidades são referidas aqui, por vezes, como quantidades "terapeuticamente eficazes". O regime de dosagem particular, isto é, a dose, temporização e repetição, dependerão do indivíduo em particular, e da sua história médica individual. Normalmente será dada uma dose de cerca de 1 até 1000 µg de conjugado/Kg de peso corporal. Podem ser requeridas administrações repetitivas podem ser requeridas para alcançar e/ou manter um estado de imuno-tolerância.

Os seguintes exemplos ilustram posteriormente o invento e as suas características imprevistas relativas à indústria anterior. Estes exemplos não pretendem limitar, de forma alguma, o invento.

#### Exemplo 1

##### Teste do Conjugado do D-EK e dos Nucleosídeos Individuais

Como indicado previamente, o desenvolvimento dos

conjugados do invento foi precedido por testes que mostraram que os conjugados do D-EK e dos nucleósidos individuais não toleravam a resposta anti-DNA no modelo murino para o SLE (ratos da espécie (NZB x NZW)F<sub>1</sub>).

1

Foram obtidos bastantes D-EK foram obtidos da BioMakor/Yeda (Rehovet, Israel). Os seus pesos moleculares relativos foram padronizados contra proteínas globulares conhecidas por cromatografia de permeação por gel HPLC, e o material foi dessalinizado e medido por diálise exaustiva em tubos "cutoff" de 25 Kd contra 0,1M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 9,5. O material

foi depois dializado duas vezes contra água. Este material é guardado em tampão com 0,1M de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 9,5, a 4° C. Os pesos

moleculares médios dos produtos foram determinados por métodos físicos, incluindo equilíbrio de sedimentação, PAGE, e HPLC-GPC, e difusão de baixo ângulo, e descobriu-se que era de, aproximadamente, 28.000. Aminoácidos analisados por hidrólise ácida mostraram que o copolímero tinha ácido glutâmico 60% e lisina 40%.

Os conjugados do D-EK e riboadenosina, riboguanosina, ribocitosina e ribotimidina foram essencialmente preparados como descrito em Eshar e outros, J. Imm. (1975) 114:872. Uma mistura de partes iguais de cada um destes conjugados (designados nucleósidos D-EK) foi utilizada nos seguintes testes.

Dois grupos de 6 ratos fêmeas (NZB x NZW)F<sub>1</sub> com 17 semanas de idade foram injectados i.p., ou com um purgante salino ou 1 mg/rato de nucleósido D-EK por dia durante três dias. Sete dias mais tarde os ratos estavam a sangrar. Duas semanas mais tarde, o tratamento foi repetido. Sete dias mais tarde os ratos

estavam a sangrar. O soro da primeira e segunda sangrias foram testadas para anticorpos anti ssDNA utilizando o seguinte protocolo ELISA do antígeno específico.

O ssDNA é imobilizado em recipientes de pratos de poliestireno e reage com anticorpos no soro de lupus MRL (lpr/lpr) dos ratos. Os anticorpos anti-ssDNA são visualizados por adição de anticorpos ligados por enzimas específicos para os isotipos de imunoglobulinas ligados ao ssDNA no prato. A adição subsequente do substrato de enzima resulta numa reacção de cor, que é lida num espectrofotômetro.

O ssDNA é preparado a partir de dsDNA de timo de vitela. O dsDNA de timo de vitela, obtido comercialmente, é tratado com nuclease S-1, para obter dsDNA homogêneo. O dsDNA é fervido durante 5 min. num banho de água, e arrefecido rapidamente num banho de gelo. Cada cozedura de ssDNA é preparada imediatamente antes de ser usada na experiência.

Noventa e seis pratos de fundo liso do recipiente são expostos à luz ultravioleta (UV), durante a noite, num Steril Gard Hood, antes do uso. Os recipientes nos pratos são revestidos na véspera a 4°C com 100 µl de ssDNA, a uma concentração de 1 µg/ml, num sal contendo 10 µg/ml de albumina metilada do soro bovino. Na manhã seguinte, os pratos são lavados uma vez, em fosfato salino dissolvido (PBS), e são depois bloqueados colocando 200 µl de albumina de soro bovino a 1% em PBS (PBSA) em cada recipiente, durante 45 min. a 37° C. Após o bloqueio, os pratos são lavados segunda vez em PBS e secados rapidamente. Depois, 100 µl de diluições série de teste e controlo de soro, diluído em PBSA a 1% e contendo 0,5% de Tween-20, são colocados

em recipientes apropriados. Os pratos são incubados durante 1 hora a 37° C. Depois estes são lavados 5 vezes em PBS e secados rapidamente, seguindo-se a adição de cem microlitros de anticorpo de fosfatase alcalina de cabra conjugada anti-rato (IgG, A e M). Os pratos são incubados durante outra hora a 37° C. Os pratos são lavados 7 vezes em PBS e secados rapidamente. Depois, 50 µl de substrato de enzima 1-x é adicionado, e os pratos são incubados à temperatura ambiente durante ½ hora. A reacção acaba pela adição de 50 µl de fosfato de hidrogénio dissódico, pH 8,6. O valor da densidade óptica a 550 nm é determinado para cada recipiente com um espectrofotómetro Titertek.

Os dados são mostrados na Figura 1. Como se mostra, o nucleósido D-EK não tem nenhum efeito detectável nos títulos anti-ssDNA nos ratos.

## Exemplo 2

### Teste de Polinucleótidos para a Actividade de Ligação com Antisera SLE.

Em adição aos polinucleótidos usados nos conjugados do invento, vários outros DNA's foram preparados e testados quanto à sua actividade de ligação com antisera SLE. Estes testes, descritos em baixo, mostram que a reactividade dos polinucleótidos dos conjugados do invento foi imprevisível e inesperável.

Vários polinucleótidos de cadeia simples e de cadeia dupla foram preparados por síntese química e, quando apropriado, extensão enzimática e/ou emparelhagem. A síntese química de oligonucleótidos foi feita num Pharmacia Gene Assembler,

utilizando uma coluna ajustável Cruachem, e química do fosfito triéster. A fase sólida foi de cristais porosamente controlados de 500 angstrom que eram derivados com o apropriado 3'-ribo ou 3'-deoxinucleótido. Os oligonucleótidos foram purificados por diálise simples. No caso de oligonucleótidos de comprimento maior que 70 bases, cadeias individuais foram fosforiladas usando ATP e quinase polinucleotídica rT4. Após dessalinização numa coluna Pharmacia PD10, as cadeias fosforiladas foram acopladas covalentemente utilizando ligase de DNA rT4. Todas as cadeias compartilham uma sequência final CATG 5' comum, que fornece um único fim viscoso. Onde apropriado, cadeias simples foram emparelhadas para formar dsDNA.

Dois ensaios foram empregues para determinar a ligação dos polinucleótidos com lupus antisera: (1) um ensaio Farr modificado, no qual o DNA radiomarcado é precipitado da solução após estar ligado ao anticorpo, e (2) um ELISA. Num molde, 25 µl de cada diluição anti-soro foi previamente preparada num sal Tris dissolvido (TBS, 0,15M de NaCl, 0,01M de Tris, pH 7,5) contendo 0,1 mg/ml de gama globulina humana. Estas foram diluídas com 125

µl de TBS, 50 µl de <sup>125</sup>I-dsDNA (Diagnostics Products Corp., Los Angeles, CA) foram adicionados a cada amostra, e as amostras foram incubadas a 37° C durante ½ hora. Depois, 500 µl de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> saturado foram adicionados, a amostra foi incubada a 4°

C durante 15 min. e centrifugada. A radioactividade do sobrenadante foi medida num contador gama. A depleção da radioactividade do sobrenadante foi uma medida directa da concentração de anticorpo na solução. No ELISA, os recipientes dos pratos foram revestidos a 4° C com 100 µl de dsDNA a 10 µg/ml

em solução salina, contendo 10 µg/ml de BSA metilado. Os recipientes foram lavados com PBS e depois bloqueados colocando 200 µl de BSA a 1% em PBS (PBSA), em cada recipiente, durante 45 min. a 37° C. Os pratos foram de novo lavados com PBS. Depois, 100 µl de soro de teste diluído em PBSA a 1%, contendo Tween 20 a 0,5%, foram adicionados. Para estudos de inibição, o inibidor (por exemplo, um polinucleótido) também foi adicionado. Os pratos foram depois incubados 1 hora a 37° C e lavados com PBS. Anticorpo de cabra marcado com fosfatase alcalina, 100 µl/célula, foi adicionado e os pratos incubados durante outra hora a 37° C. Os pratos foram depois lavados, o substrato foi adicionado, e os pratos foram incubados numa estufa durante ½ hora. A reação foi parada pela adição de fosfato de hidrogênio dissódico e os pratos foram lidos com um espectrofotômetro.

As tabelas 1 e 2 apresentam, a seguir, respectivamente, vários polinucleótidos de cadeia simples e polinucleótidos de cadeia dupla que não inibem significativamente o dsDNA, ligados por auto-anticorpos SLE nestes testes.

TABELA 1

HOMOPOLIMEROS NUCLEOTIDICOS DE CADEIA SIMPLES QUE ABAIXO DE 500nm NÃO INIBIAM SIGNIFICATIVAMENTE O dsDNA LIGADOS A MURINA (MRL) OU AUTO-ANTICORPOS SLE HUMANOS

composição	n-mer	composição	n-mer
-----			
A. Homopurinas			
poli d(G)n	1219 *	poli d(A)n	390 *
	350 *		60
	32		32
	22		22
	12		12
	6		6

B. Homopirimidinas	3		3
poli d(C)n	329 *	poli d(T)n	229
	60		60
	30		30
	24		22
	22		6
	12		3
	6		
	3		

\* Enzimaticamente sintetizada, utilizando polimerase rT4 DNA. Porque os pesos moleculares são uma distribuição, os valores de n para os oligômeros sintetizados enzimaticamente constituem um número médio do peso, estimado a partir do valor Sw,20 de cada.

## TABELA 2

EXEMPLOS DE DUPLEXES OLIGONUCLEOTIDOS ATÉ 32 PARES DE BASES QUE ABAIXO DE 500 nM NÃO INIBIAM SIGNIFICATIVAMENTE A LIGAÇÃO DO dsDNA A MURINA (MRL) OU ANTISERA SLE HUMANO

### A. HOMOPOLIMEROS

#### Regular

Exemplos: [A]<sub>30</sub> : [T]<sub>30</sub> , [G]<sub>25</sub> : [C]<sub>25</sub> , [I]<sub>20</sub> : [C]<sub>20</sub>

### B. HETEROPOLIMEROS

#### 1. Auto-alinhamento

Exemplo: [G]<sub>2</sub> - [A]<sub>10</sub> - [C]<sub>2</sub> : [G]<sub>2</sub> - [T]<sub>10</sub> - [C]<sub>2</sub>

#### 2. Dímeros de repetição

Exemplos: [AT]<sub>16</sub> : [AT]<sub>16</sub> , [AC]<sub>10</sub> : [GT]<sub>10</sub>

#### 3. Trímeros de repetição

Exemplos: [TTC]<sub>8</sub> : [GAA]<sub>8</sub> , [TTG]<sub>8</sub> : [CAA]<sub>8</sub>

#### 4. Tetraímeros de repetição

Exemplo: [ACGT]<sub>6</sub> : [ACGT]<sub>6</sub>



TABELA 3

EXEMPLOS DE DUPLEXES OLIGONUCLEOTIDOS QUE ABAIXO DE 500 nM (<1 menor que 500 nM) INIBIAM SIGNIFICATIVAMENTE A LIGAÇÃO DO dsDNA AO SORO HUMANO SLE E AO SORO DA MURINHA (MRL)

Composição	n Maior que	Comprimento do Oligômero
d(AC) <sub>n</sub> : d(TG) <sub>n</sub>	20	40 ou maior
d(AT) <sub>n</sub> : d(TA) <sub>n</sub>	20	40 ou maior
d(IC) <sub>n</sub> : d(CI) <sub>n</sub>	20	40 ou maior
d(AC) <sub>n</sub> : d(TG) <sub>n</sub>	20	40 ou maior
d(AG) <sub>n</sub> : d(TC) <sub>n</sub>	20	40 ou maior
d(ATC) <sub>n</sub> : d(GAT) <sub>n</sub>	15	45 ou maior
d(TAC) <sub>n</sub> : d(ATA) <sub>n</sub>	15	45 ou maior

### Exemplo 3

#### Correlação da Actividade de Ligação com o Espectro CD

As medidas espectrais do CD foram concretizadas em poli(AT): poli(AT) de cerca de 228 bp em comprimento (por exemplo de A-DNA), poli(GC): poli(GC) de aproximadamente 330 bp em comprimento (por exemplo, de Z-DNA), esperma de salmão DNA de comprimento médio maior que 1200 bp (um exemplo do DNA nativo com um tipo B-DNA com configuração helicoidal) e o duplex (AC)<sub>30</sub> : (TG)<sub>30</sub> acima descrito. Ensaios de ligação do antisera SLE nestes oligonucleótidos e no DNA foram concretizados utilizando o ensaio Farr modificado como atrás.

Todos os DNA's e oligonucleótidos foram dissolvidos em dissolvente padrão (0,15M de NaCl, 0,1M de citrato de sódio, pH 7,0), e as suas relativas capacidades para ligar ao sera H-SLE auto-imune foram comparadas às suas capacidades respectivas para absorver a luz monocromática polarizada circularmente à esquerda e à direita (espectroscopia CD). Os dados serológicos são

expressos como a capacidade para inibir a ligação do dsDNA ao sera; o espectro é apresentado como uma elipticidade molar por residuo nucleòtido:

$$[\theta] = 100/c.L.$$

onde  $\theta$  é a elipticidade observada em graus, L é o comprimento do encaminhamento na célula em cm, e c é a concentração em moles de nucleòtidos por litro.

A Figura 2 mostra o espectro CD do poli(AT): poli(AT).

A Figura 3 mostra o espectro CD do poli(GC): poli(GC) (linha a cheio interrompida com círculos a cheio), o esperma de salmão DNA (linha tracejada), e o duplex (AC) : (TG) (linha 30 30 continua a cheio).

A Figura 4 mostra as capacidades relativas das diferentes formas de DNA para ligar ao antiserá SLE. Como é mostrado, o DNA tipo B sintético tem reactividade similar ao DNA tipo B (foi utilizado o timo DNA de vitela), e reactividade substancialmente maior que qualquer DNA tipo A ou tipo Z. (O tipo helicoidal foi caracterizado pelo espectro CD e, como indicado em cima, pode não ser conclusivo.)

#### Exemplo 4

##### Síntese do Conjugado D-EK do (AC) : (TG) 30 30

Com base na actividade de ligação e estabilidade, o duplex (AC) : (TG) descrito acima foi seleccionado para 30 30 estudos de tolerância genética. Um conjugado deste duplex e um copolímero D-EK foi preparado utilizando o procedimento de síntese preferido, em cima delineado. Seguem-se os detalhes desta síntese.

O copolímico D-EK, B:L mol com uma relação de 60:40, MW<sub>med</sub> = 30.000 daltons foi preparado a partir do material obtido da BioMakor, Rehovet, Israel. Este copolímico foi dializado contra 0,1M de KHCO<sub>3</sub>, pH 9,5, em tubos de diálise com um grau de admissão de peso molecular de 25.000 daltons, para uma concentração final de 20 mg/ml, como determinado pela absorvância a 220 nm numa cuvete de 1 cm, em que:

$$\text{D-EK mg/ml} = \frac{A_{220} (30.000 \text{ mg/nmol})}{(168.000 \text{ mL/cm nmol})}$$

O (AC)<sub>30</sub> foi sintetizado num sintetizador DNA e dializado contra água desionizada em tubos de diálise com um grau de admissão de peso molecular de 12.000 - 14.000 daltons. A solução resultante é ajustada para uma concentração final de 35 mg/ml, como determinado pela absorvância a 260 nm numa cuvete de 1 cm, em que

$$(\text{AC})_{30} \text{ mg/ml} = \frac{A_{260} (18.106 \text{ mg/nmol})}{(458.160 \text{ mL/cm nmol})}$$

Uma solução aquosa de periodato de sódio, 0,1M, e água foi adicionada ao (AC)<sub>30</sub> para dar uma reacção de mistura com um excesso molar de 5:1 do periodato para o DNA. A mistura foi bem agitada e depois colocada a 4° C durante 15 min.. O excesso de periodato foi então precipitado pela adição de um excesso de cloreto de potássio e o precipitado foi removido por centrifugação.

Uma solução de D-EK e cianoboroidrido de sódio foi pipetada num vaso de reacção de polipropileno e o pH foi ajustado entre 6,0 e 8,0. O (AC)<sub>30</sub> oxidado foi adicionado gota-a-gota ao D-EK numa relação de peso de 6,035:1 (relação molar de conjugação

de 10:1), com agitação vigorosa durante 24 - 48 horas a 4°C. Após condensação, foi adicionado boroidrido de sódio sólido à mistura da reação, com agitação, até ser atingida uma concentração final de 1,0 mg/ml. O vaso da reação foi mais ou menos encapsulado e deixou-se ficar, sem ser agitado, durante, pelo menos, 30 min.. A mistura da reação foi depois transferida para os tubos de diálise com um grau de admissão de 50.000 daltons e foi dializada extensivamente contra 0,2M de citrato de sódio, pH 5,0, a 4°C.

O conjugado foi depois purificado numa coluna cromatográfica de permeação de gel Sephacryl S-200, em 0,2M de fosfato de sódio, 0,5M de cloreto de sódio, pH 7,2. As frações foram analisadas quanto à concentração de oligonucleótidos por OD<sub>260</sub>, e quanto à concentração de D-EK por um ensaio de sulfonato

de trinitrobenzeno (Albers, R. W., e outros, Analyt Biochem (1983) 137:437-443). A separação do conjugado do oligonucleótido

livre foi determinada por uma <sup>32</sup>P-quinase rotulada de 5'hidroxil na cadeia oligonucleotídica, seguida por uma poliacrilamida a 10%, 8M de gel sequenciando ureia, e autoradiografia. O gel foi cortado e contado num contador beta de cintilação líquida, e essas frações exibindo ≥ 95% de pureza foram agrupadas e dializadas contra 0,01M de citrato de sódio, 0,15M de cloreto de sódio, pH 7,0 (dissolvente de formulação) em preparação para emparelhagem.

O (TG)<sub>30</sub> foi preparado como descrito em cima e dializado contra o dissolvente de formulação, da mesma maneira que o (AC)<sub>30</sub>. A concentração molar de nucleótidos (MNC) do (TG)<sub>30</sub>

foi determinada pela medição da absorvância a 260 nm numa cuvete de 1 cm:

$$\text{MNC (TG)}_{30} = A_{260 \text{ nm}} / (9164 \text{ mL/cm mmol})$$

O MNC do conjugado do (AC)  $\frac{-D-EK}{30}$  foi determinado pela

medição da absorvância da solução dializada a 260 nm:

$$\text{MNC (AC)} \frac{-D-EK}{30} = A \frac{1}{260 \text{ nm}} / (7636 \text{ mL/cm mmol})$$

O (TG)  $\frac{30}{30}$  foi depois emparelhado com o conjugado do

(AC)  $\frac{-D-EK}{30}$  como se segue. Um MNC do (TG)  $\frac{30}{30}$  igual foi adicionado

ao reagente de limitação do (AC)  $\frac{-D-EK}{30}$  num recipiente de

propileno ou de vidro. A mistura foi aquecida até  $> 95^\circ \text{ C}$  num banho de água, que foi mantido entre  $95^\circ \text{ C}$  e  $98^\circ \text{ C}$  durante 10 min.. A solução foi depois suavemente arrefecida à temperatura ambiente a uma taxa  $\leq 10^\circ/\text{hora}$ .

O produto emparelhado é dializado contra o dissolvente de formulação em tubos de diálise com um grau de admissão de peso molecular de 50.000 daltons. Após diálise extensiva, o conjugado final é filtrado esterilmente através de uma membrana de  $0,22 \mu\text{m}$ . É caracterizado por espectroscopia UV, cromatografia líquida com gel de permeação de alta resolução, electroforèse com gel poliacrilamida e termografia antes do enchimento estéril.

#### Exemplo 5

Teste dos Conjugados do (TG)  $\frac{30}{30}$  : (AC)  $\frac{-D-EK}{30}$  como um

#### Toleragénio

O conjugado do (TG)  $\frac{30}{30}$  : (AC)  $\frac{-D-EK}{30}$ , descrito acima, foi

testado no modelo murino MRL (lpr/lpr) para o SLE humano. Um defeito genético nesta espécie de rato conduz a hiperproliferação de células auxiliares T que, em todas as possibilidades, participam em diferenciação autoreactiva das células B. Estes resultados em secreção de anticorpos para o DNA, bem como uma

pletora de outros anticorpos. Como indicado previamente, os anticorpos para o dsDNA são um contraste do SLE humano e a sua presença correlaciona-se bem com a severidade da doença e a patologia renal nos seres humanos.

O conjugado foi diluído numa solução salina até à concentração desejada, para injeção i.p. nos ratos. Foram usados quatro grupos de cinco ratos com 12 a 14 semanas de idade cada. Os ratos sangraram na manhã do dia 1 e foram injectados de tarde. Consequentemente, os ratos sangraram de manhã e foram injectados de tarde cada semana, durante mais cinco semanas. Nas semanas 6 e 7 os ratos apenas sangraram. O Grupo 1 (controlo) foi injectado com 0,3 mg de copolímero D-EK/semana/rato; o Grupo 2, com 0,1 mg do conjugado/semana/rato; o Grupo 3, com 0,3 mg do conjugado/semana/rato; e o Grupo 4, com 1,0 mg do conjugado/semana/rato.

As amostras de plasma retiradas dos ratos foram diluídas 1:10 e 1:50 em dissolvente Tris (0,1M, pH 7,4) e usadas no ensaio Farr modificado descrito em cima, usando <sup>3</sup>H-dsDNA em vez de <sup>125</sup>I-dsDNA para determinar a titulação do anticorpo anti-dsDNA das amostras. Os dados obtidos no ensaio Farr modificado foram convertidos em capacidade de ligação do antigénio e estão traçados na Figura 5 (o conjugado é designado por LJP-105).

Quatro semanas depois do fim do tratamento, dois ratos de cada grupo e ainda um rato do grupo de controlo foram sacrificados, e os níveis de secreção de anticorpos anti-dsDNA em cada grupo foram determinados numa célula do baço por ELISA onde  $1 \times 10^6$  até  $1,5 \times 10^4$  células do baço em diluições duplas foram colocadas em cada célula. Os resultados desses testes são

relatados na Figura 6.

Uma experiência do conjugado foi também realizada em ratos MRL mais velhos, com 22 a 24 semanas. De novo, os ratos foram doseados por i.p. uma vez por semana, durante quatro semanas. Os níveis serológicos de anti-dsDNA foram determinados após um mês de tratamento, e foram comparados aos valores antes da sangria obtidos no início. Esses dados, expressos como uma mudança percentual em capacidade de ligação do antígeno (ABC) para ratos individuais, são mostrados na Figura 7. A Figura 7a mostra os dados médios desses testes. A variabilidade nos ratos por grupo de dosagem (conjugado: 0,01, 0,1, 0,3 e 1,0 mg/rato; os ratos de controle recebiam uma mistura do polímero portador e do ácido nucleico inconjugado substituto) reflecte as mortes durante a experiência.

Os dados do ensaio das células do baço da experiência terapêutica são apresentados na Figura 8, demonstrando de novo uma diferença significativa entre os ratos de controle e os tratados com conjugado, e confirmam os resultados serológicos prévios. Como experiência de controle, mostrou-se que o dsDNA solúvel inibia o ensaio das células do baço. Adicionalmente, adicionando as células do baço de animais tratados com polinucleótidos às células de controle do baço, não decresciam de cor; de preferência, o efeito foi aditivo, determinando assim que aquele conjugado da célula limite tenha inibido o ensaio.

Finalmente, mostrou-se que o conjugado pode ser eficaz por via i.p, i.m, ou i.v.. Ratos fêmeas MRL, com vinte e duas semanas, foram doseados com 0,1 mg de conjugado por semana durante quatro semanas, e medida a variação percentual na

1

2

•

(AC) 63' são sintetizados e fosforilados por métodos padrão. Os

•



Colônias resistentes de Ampicilina são apanhadas, desenvolvidas e isoladas do plasmídeo DNA. O tamanho de inserção é determinado digestão com restrição. O clone desejado tem uma inserção que compreende, pelo menos, metade do plasmídeo ou > 50, 60 unidades mer.

O clone resultante está desenvolvido em larga escala e isolado do plasmídeo. O plasmídeo é digerido com EcoRI e HincII para libertar 60 mer com uma saliência EcoRI de 4 bases e um fim brusco no extremo oposto e gerado pelo HincII. Os oligômeros são purificados e emparelhados com o D-EK que tem o oligômero de 4 bases 3'TTAA-P com um fosfato 5' covalentemente ligado ao D-EK através do 3'T. Os 60 mers são emparelhados e ligados covalentemente ao D-EK/TTAA por ligase.

#### Produção PCR de 60 mer

A reacção em cadeia da polimerase é utilizada para sintetizar 60 mers para acoplar ao D-EK, pelos métodos descritos nas referências acima citadas.

Em resumo, o (GT)<sub>30</sub> é quimicamente sintetizado com pequenas sequências aleatórias tais como GACT e CTGA, no extremo 5'e 3' do (GT)<sub>30</sub>, respectivamente (como ilustrado a seguir). As pequenas sequências aleatórias são suficientemente longas para assegurar registos característicos do "primer" para o modelo. O "primer" contém a sequência da sequência aleatória, mais várias repetições extra do GT como necessário para a estabilidade na reacção de emparelhagem. Um dos "primers" também tem uma base extra modificada no fim 5', que permite acoplagem química ao D-EK.

A reacção PCR é realizada durante, pelo menos, 20 ciclos segundo os métodos citados em cima. Os oligómeros produzidos por PCR são purificados por cromatografia, tal como o HPLC, e depois conjugado para o D-EK por um dos procedimentos acima descritos.

"PRIMER" 1:

(CA)-GACT5'

MODELO 1:

5'\*NGACT-(GT) -CTGA3'

"PRIMER" 2:

5'\*GACT-(GT)

MODELO 2:

3'CTGA-(CA) -TACG5'

\*N = base modificada para acoplamento ao D-EK

### REIVINDICAÇÕES

1- Um conjugado de (a) um polímero biologicamente estável, e (b) uma multiplicidade de duplexes polinucleotídicos de, pelo menos, 20 pares de base, cada um ligado ao polímero, caracterizado pelo facto de os referidos duplexes possuírem, cada uma ligada, uma actividade de ligação significativa para os auto-anticorpos anti-DNA de cadeia dupla do lupus eritematoso sistémico humano.

2- Um conjugado, conforme reivindicado na reivindicação 1, caracterizado pelo facto de o polímero biologicamente estável ser um copolímero de ácido D-glutâmico (E) e D-lisina (K) tendo um peso molecular de cerca de 5.000 a cerca de 50.000 e uma proporção de moles E:K de, aproximadamente, 60:40.

3- Um conjugado, conforme reivindicado na reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo facto de os duplexes serem substancialmente homogêneos em comprimento.

4- Um conjugado, conforme reivindicado na reivindicação 3, caracterizado pelo facto de os duplexes serem substancialmente homogêneos na composição nucleotídica.

5- Um conjugado, conforme reivindicado nas reivindicações 1, 2, 3 ou 4, caracterizado pelo facto de os duplexes terem de 30 a 250 pb em comprimento.

6- Um conjugado, conforme reivindicado nas reivindicações 1, 2, 3, 4 ou 5, caracterizado pelo facto de os duplexes serem ligados ao polímero na, ou próximo de uma das suas extremidades.

7- Um conjugado, conforme reivindicado na reivindicação 6, caracterizado pelo facto de os duplexes serem ligados ao polímero através de uma reacção entre um grupo funcional em, ou próximo do terminus de uma cadeia do duplex e dos grupos amino livres no polímero.

8- Um conjugado, conforme reivindicado nas reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7, caracterizado pelo facto de os duplexes polinucleotídicos serem compostos de unidades mer de repetição complementares, de 2 a 4 bases diferentes.

9- Um conjugado, conforme reivindicado na reivindicação 8, caracterizado pelo facto de os duplexes polinucleotídicos serem:

poli d(GC):poli d(CG); poli d(AT):poli d(TA);

poli d(IC):poli d(CP); poli d(AC):poli d(TG); ou

poli d(AG):poli d(TC).

10- Um conjugado, conforme reivindicado na reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo facto de o duplex polinucleotídico ser

(AC) : (TG) .  
30 30

11- Uma composição farmacêutica para tratamento do lupus, compreendendo o conjugado das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10, caracterizada pelo facto de ser formulada com um veículo injectável, farmacêuticamente aceitável.

12- Um polinucleótido de cadeia simples de, pelo menos, 20 bases, possuindo um grupo funcional em, ou próximo de um dos seus terminus que reagirá com um grupo amino livre, quando emparelhado com um polinucleótido de cadeia simples complementar, caracterizado pelo facto de possuir uma actividade de ligação significativa quanto aos auto-anticorpos anti-DNA de cadeia dupla do lupus sistémico humano.

13- Um polinucleótido de cadeia simples, conforme reivindicado na reivindicação 12, caracterizado pelo facto de ser constituído de uma unidade mer de repetição, de 2 a 4 bases diferentes.

14- Um método para a obtenção do conjugado da reivindicação 1, caracterizado pelo facto de compreender:

(a) a reacção de uma multiplicidade de polinucleótidos de cadeia simples, de, pelo menos 20 pares de base, cada um dos quais possui um grupo funcional amino-reactivo em, ou próximo dos seus terminus, formando os grupos amino livres, no polímero, um conjugado,

(b) o emparelhamento de polinucleótidos de cadeia simples complementares com os polinucleótidos de cadeia simples conjugados com o polímero, para formar cadeia pares do DNA de cadeia dupla.

Lisboa, 16 de Janeiro de 1991

PELO AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL  
O ADJUNTO




FIG. I

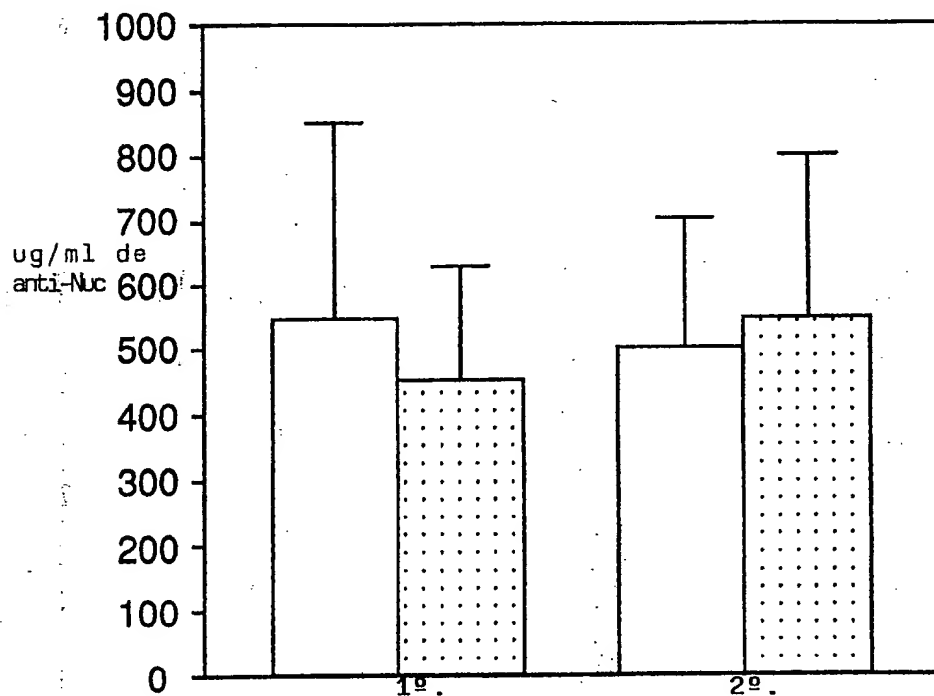
Incapacidade do Nucleósido do D-EK para Tolerar anti-ssDNA  
EM Ratos (NZB x NZW)F1



Controlo Salino

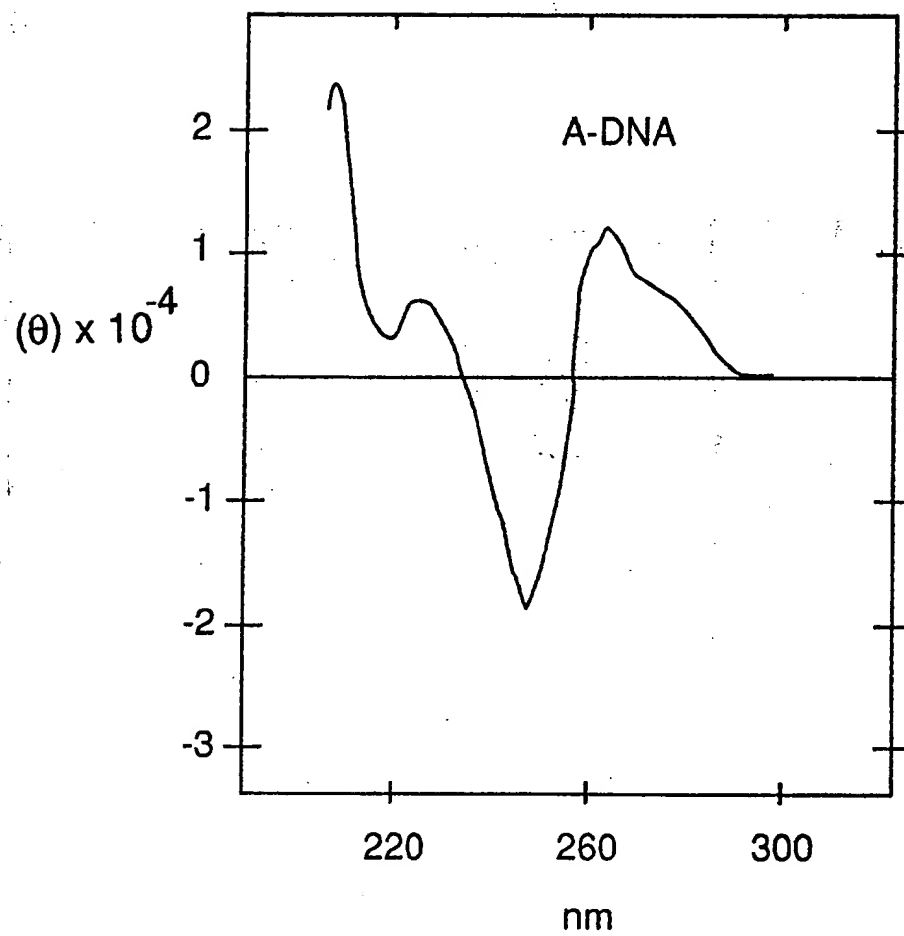


Nucleósido D-EK



Ratos fêmeas (NZB x NZW)F1, com 17 semanas de idade, tratados em três dias sucessivos com 1mg/rato de nucleósido D-EK, sangrados 7 dias depois (1º.), descansados durante duas semanas, e tratados de novo três vezes com 1mg/rato de nucleósido D-EK, e sangrados de novo 7 dias depois. Tanto o 1º. como o 2º. grupos de sera foram testados quanto à quantidade de anti-ssDNA por ELISA. Os dados representam a média e o desvio padrão dos 6 ratos em cada grupo.

FIG. 2



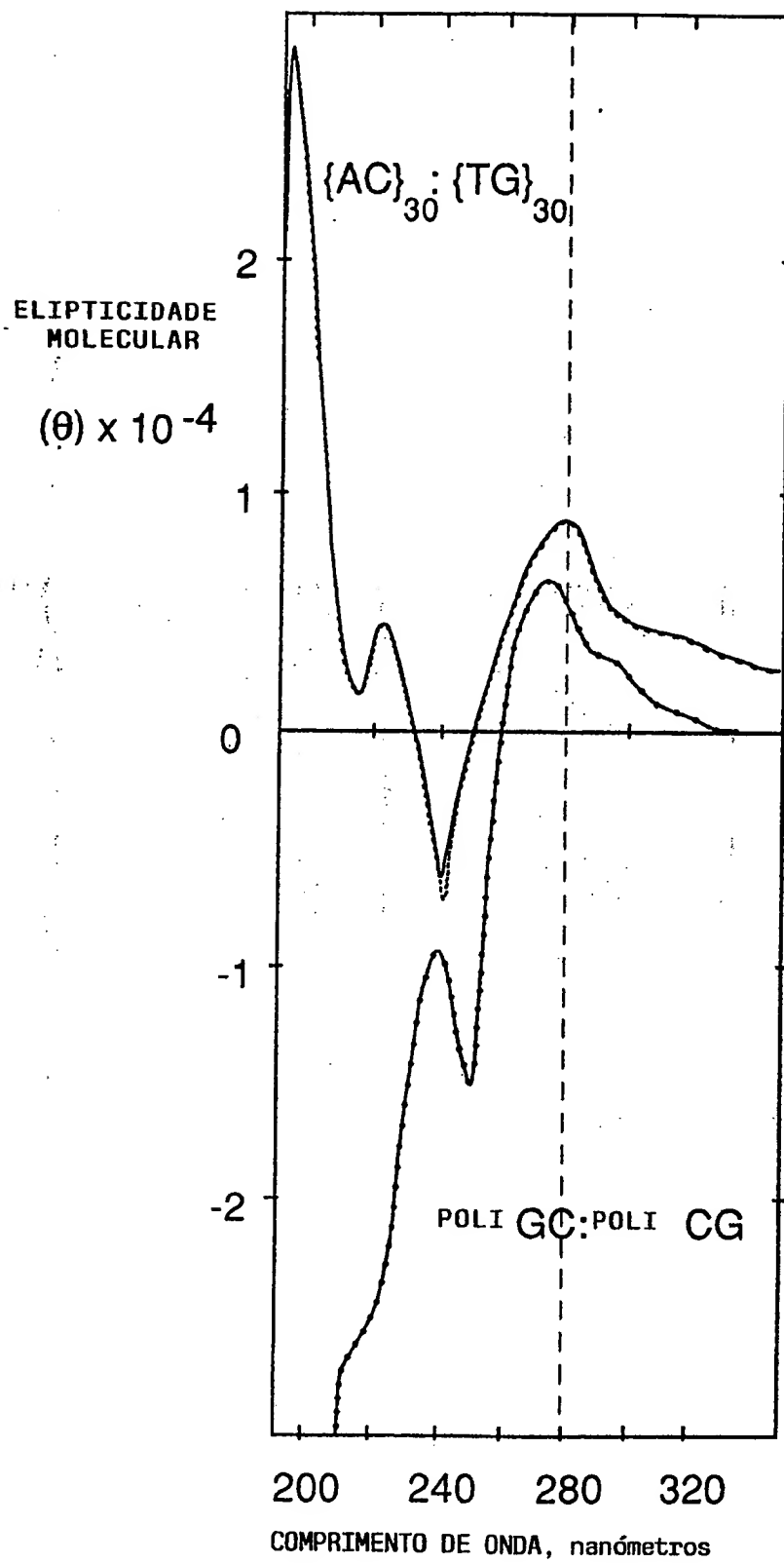


FIG.3



FIG. 4

INIBIÇÃO DO SORO II-SLE DE LIGAÇÃO AO 3H-DNA POR VARIAS CADEIAS DUPLAS DE DNA's

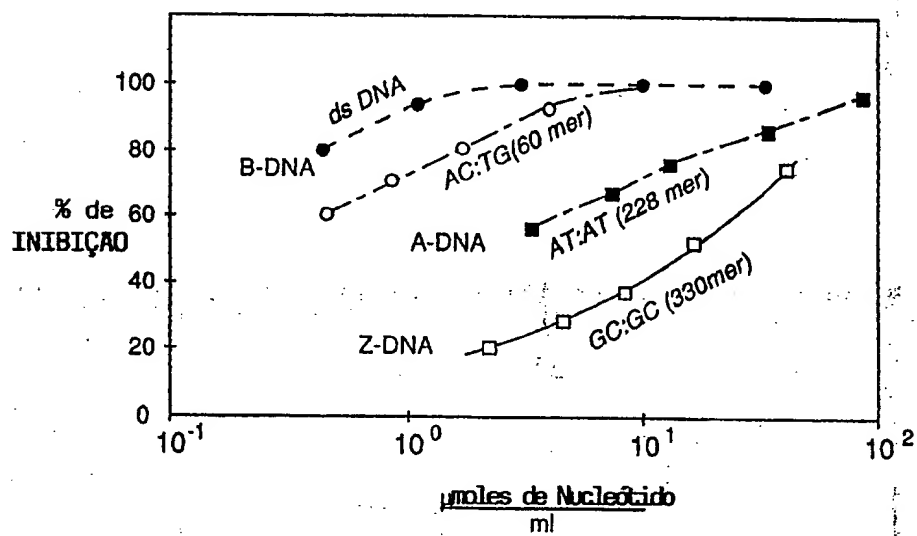
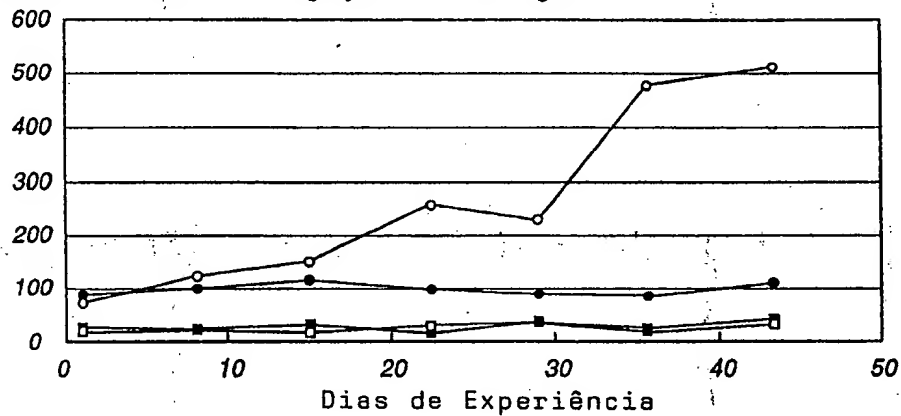


FIG. 5

**LJP-105 - TOLERANCIA INDUZIDA NOS RATOS MRL**  
Prevenção da Síntese do Anti-dsDNA

Capacidade Média de Ligação do Antígeno



tratamento

○ controle polimérico ● 0.1 mg LJP-105  
■ 0.3 mg LJP-105 □ 1.0 mg LJP-105

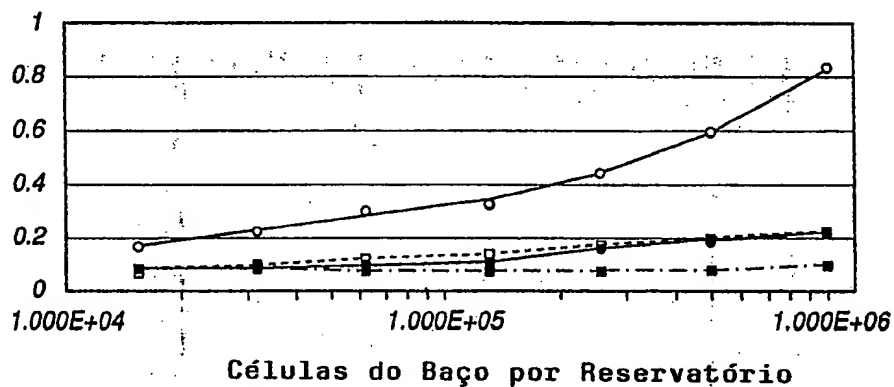
via de administração: i.p. (semanal)

FIG. 6

## INDUÇÃO DA TOLERANCIA PELO LJP-105

Anticorpos Anti-dsDNA em Células MRL Cultivadas

Densidade Óptica 550 nm



Grupo de Tratamento

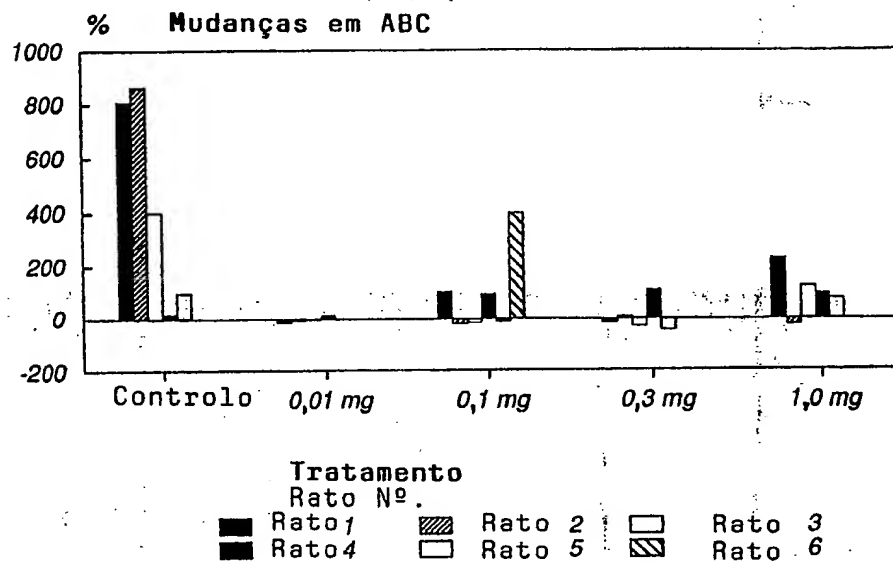
○ Controlo Polimérico    ● 0.1 mg/ Rato  
■ 0.3 mg/ Rato        □ 1.0 mg/ Rato

OD = 0,050 em Controlos Sem Células

FIG. 7

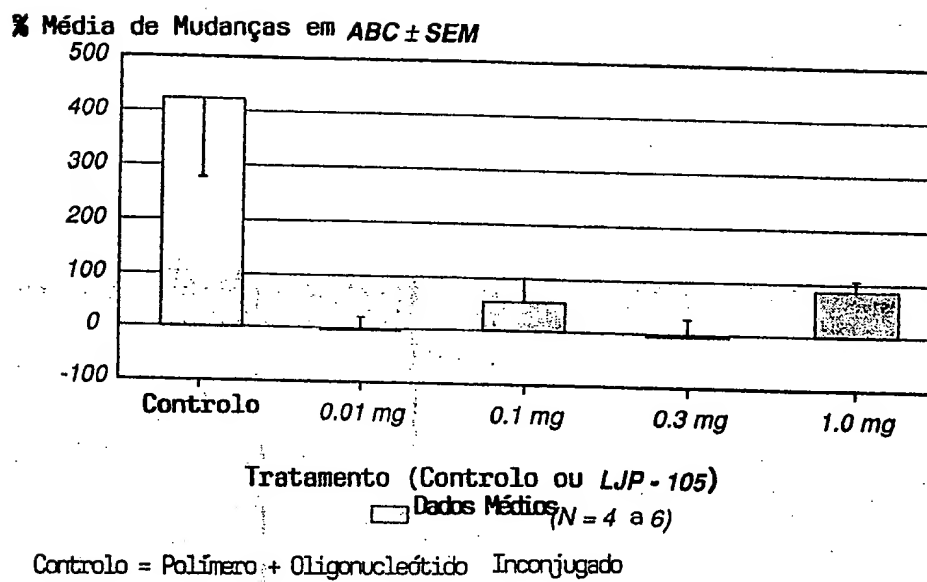
## EXPERIENCIA TERAPEUTICA DO LJP-105

Ratos MRL doseados 4 vezes durante 4 Semanas



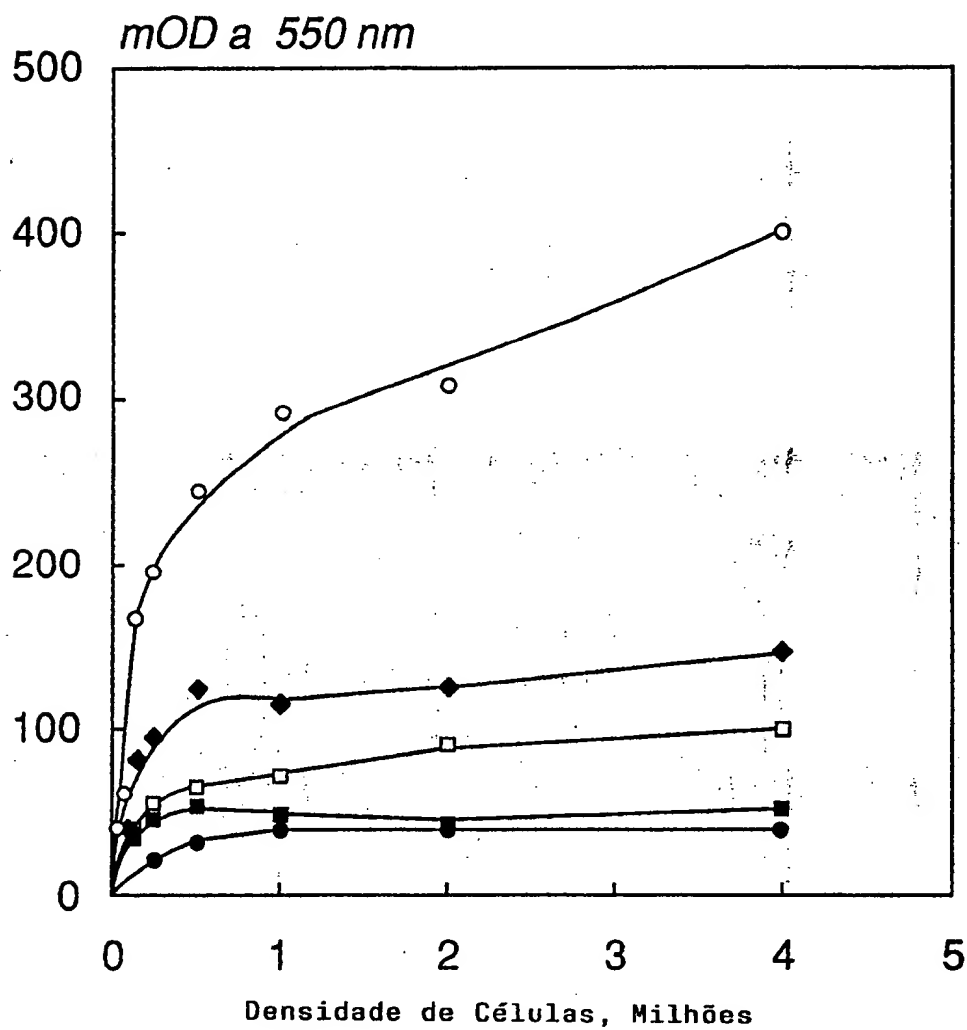
Via de administração: i.p.

FIG. 7A



ENSAIO DA CELULA DO BAÇO MURINO  
Experiência Terapêutica (D5)

FIG. 8



ELISA anti-dsDNA

10000 1 0160

1991/07/31

1 RESUMO

FAT.

96303 0

FAT.

"PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE CONJUGADOS DE POLÍMEROS E  
POLINUCLEÓTIDOS BIOLÓGICAMENTE ESTÁVEIS PARA O TRATAMENTO DO  
LUPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO"

Esta invenção refere-se a um processo para o fabrico de conjugados de polímeros biologicamente estáveis, e DNA de cadeia dupla, que são toleráveis geneticamente ao lupus eritematoso sistémico humano (SLE), no qual (1) polinucleótidos de cadeias simples de, pelo menos, cerca de 20 bases em comprimento, no qual cada um tem um grupo funcional amino-reactivo em, ou próximo de um dos seus terminais, e no qual cada um, quando hibridizado com um polinucleótido de cadeia simples, forma um duplex que possui uma actividade de ligação significativa para os anticorpos anti-dsDNA SLE, reagem com polímeros biologicamente estáveis possuindo grupos amino livres para formar um conjugado, e (2) hibridização complementarmente de polinucleótidos de cadeia simples a polinucleótidos de cadeia simples conjugados com o polímero, para formar cadeias pendentes de DNA de cadeia dupla.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: \_\_\_\_\_**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**